

EP 0,749,755 A2  
EP 0,749,755 A3

*no  
physical  
challenges*

---

Job No.: 1505-89893

Translated from French by the Ralph McElroy Translation Company  
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

EUROPEAN PATENT OFFICE  
EUROPEAN PATENT NO. 0 749 755 A2

Int. Cl. <sup>6</sup> :	A 61 K 49/00
Filing No.:	96401170.4
Filing Date:	May 31, 1996
Publication Date:	December 27, 1996 Bulletin 1996/52
Designated Contracting States:	CH DE FR GB LI
Priority	
Date:	June 19, 1995
Country:	FR
No.:	9507302

PROCESS FOR IDENTIFYING RARS RECEPTOR ANTAGONIST COMPOUNDS

Inventors:	Michel Demarchez 06620 Le Bar sur Loup (FR)  André Jomard 06460 Saint Vallier de Thiey (FR)
Applicant:	INTERNATIONAL CENTER FOR DERMATOLOGICAL RESEARCH, GALDERMA (C.I.R.D. GALDERMA) F-06560 Valbonne (FR)
Agent:	Christophe André Louis Andral L'OREAL Charles Zviak Research Center Industrial Property Department 90, rue du Général Roguet 92583 Clichy Cedex (FR)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

### [Abstract]

This invention pertains to a process for identifying RARs antagonist molecules, characterized in that it includes the following stages: (i) a sufficient quantity of a RARs agonist molecule is applied topically to part of the skin of a mammal; (ii) a molecule capable of exhibiting RARs antagonist activity is administered systemically or topically to the same mammal or to this same part of the mammalian skin before, during, or after stage (i); and (iii) the response of the part of the mammalian skin treated in this way is evaluated.

### Description

The object of this invention is a process for identifying RARs receptor antagonist compounds by using a mammalian species, such as rodents (rats, guinea pigs, hamsters, rabbits, mice, etc.).

It is known that all-trans retinoic acid is a powerful modulator (i.e., an inhibitor or, conversely, a stimulator, depending on the nature of the treated cells) of the differentiation and the proliferation of numerous normal or transformed cell types. For example, it inhibits the differentiation of epithelial cells such as the keratinocytes of the epidermis. It also inhibits the proliferation of numerous transformed cells such as melanoma cells.

In general, it is known that all-trans retinoic acid acts on cell differentiation and proliferation by interacting with nuclear receptors called RARs (Retinoic Acid Receptors) contained in the cell nucleus. These receptors, after fixation of the ligand (i.e., the all-trans retinoic acid), interact with the promoter region of genes regulated by retinoic acid at the level of specific response elements. To attach themselves to the response elements, the RARs become heterodimerized with another type of receptors known as RXRs, the natural ligand of RXRs being 9-cis-retinoic acid.

Numerous structural synthetic analogues of all-trans retinoic acid or 9-cis-retinoic acid, commonly called "retinoids," have already been described in the literature. Some of these molecules are capable of becoming fixing and activating (agonists) or, conversely, of deactivating (antagonists) the RARs specifically. For example, all-trans retinoic acid selectively activates the RARs, and thus is considered as an agonist molecule of the RARs.

In mice, it has been shown that all-trans retinoic acid in a single topical administration induces a dose-dependent response of epidermal proliferation with a maximum response four days after application ("Retinoic acid provokes a regeneration-like proliferative response in murine epidermis," Arch. Dermatol. Res. 1992, 284:418-423). In accordance with this result, the response to a topical application of all-trans retinoic acid to the ear of a mouse is expressed, in particular, by an increased thickness of the mouse's ear. This increase in the thickness of the mouse's ear seems to be due to an increase in the thickness of the epidermis and to an

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

appearance of dermal edema. Therefore, this response can be readily measured with an apparatus such as the Oditest; the response is greater on the fifth and sixth days after application. This response is verified with all the agonist molecules of the RARs.

With respect to the RARs antagonists, these have proven to be particularly interesting in the treatment of dermatological, rheumatic, respiratory, cardiovascular, bone, and ophthalmic disorders, particularly those connected with overregulation (overexpression or overactivity) of the RARs receptors and/or vitamin A hypervitaminosis (presence in the body of an abnormal quantity of vitamin A or its metabolites). Thus, the value of finding new RARs antagonist compounds that can inhibit the biological effects of overregulation of the RARs receptors and/or vitamin A hypervitaminosis is easy to understand.

The applicant has discovered that the response to a topical application to mammalian skin of an RARs agonist molecule can be inhibited by systemic or topical administration of an RARs antagonist molecule.

Thus, the object of this invention is to propose a simple procedure for identifying RARs antagonist molecules.

This goal and others are attained by this invention, which concerns a process for identifying RARs antagonist molecules characterized in that it includes the following stages: (i) a sufficient quantity of at least one RARs agonist molecule is applied topically to part of the skin of a mammal; (ii) a molecule capable of RARs antagonist activity is administered systemically or topically to this same mammal or on this same part of the mammal's skin before, during, or after stage (i); and (iii) the response of the part of the mammal's skin treated in this way is evaluated, and it is compared with the response obtained on this same part of the skin treated by only stage (i).

Thus, when the molecule administered is a RARs antagonist, the increase in the thickness of the part of the mammal's skin treated by a RARs agonist molecule is not observed, or is decreased. Therefore, the response is inhibited.

In practice, the mammal is a rodent such as a mouse, a rat, a guinea pig, a hamster, or a rabbit.

The part of the mammal's skin used can be any part of the mammal's body:

The response on the treated part of the mammal's skin to be evaluated corresponds to a clinical modification of the skin. In general, this response to be evaluated corresponds to a change in the thickness of the part of the skin that has been treated.

Thus, the thickness of the treated skin can be measured by any known method.

When the part of the skin used is smooth, its thickness can be measured by folding it.

It is most expedient to use the skin of the ear. The thickness of the skin on the ear can be measured by an Oditest.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Of course, the evaluation of stage (iii) corresponds to a measurement of the response of the part of the skin treated and to a comparison of this measurement with that of the response of this same part of the skin that is treated, under the same conditions, with the RARs agonist molecule alone.

It is preferable for the RARs agonist molecules to be chosen from the compounds that can induce the differentiation of murine embryo teratocarcinoma (F9) cells. The secretion of the plasminogen activator that accompanies this differentiation is an index of the biological response of the F9 cells to these compounds. It is also known that the capacity of these compounds to induce the plasminogen activator is correlated directly with their affinity and activity on the RARs endogenous receptors to the F9 cells (Skin Pharmacol., 1990, 3:256-267).

Examples of the RARs agonist molecules that induce differentiation of F9 cells include:

- all-trans retinoic acid
- 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)-6-benzo[b]thiophene carboxylic acid;
- 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carboxamide]benzoic acid;
- 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl]benzoic acid.

In the sections below and in the preceding one, the term "topical" means any technique of administering a product by direct application of this product to a superficial part (or external part) of the body. "Systemic" means any administration technique of a product by a route other than topical, e.g., enteral and/or parenteral. In the case of the systemic route, the oral route is preferred.

The sufficient quantity of an RARs agonist molecule to be applied corresponds to the quantity at which a response of the treated part of the skin of the mammal is observed after stage (i). Preferably, and depending on the nature of the RARs agonist molecule used, this quantity ranges from 0.0001 wt% to 2 wt % per volume of solution applied.

Several non-limiting examples will now be presented.

### Example 1

The test used is the mouse ear edema test, induced by topical application of 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)-6-benzo[b]thiophene carboxylic acid (analog of all-trans retinoic acid) at 0.01 wt% by volume. In this model, a topical application of 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)-6-benzo[b]thiophene carboxylic acid to the ear causes inflammation characterized by an increase in the thickness of the mouse's ear, this increase becoming greatest 5 days after application. Therefore, this response can be quantified by measuring the ear thickness with an Oditest.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The exact operating protocol is as follows: 10 mice are first treated with 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)-6-benzo[b]thiophene carboxylic acid (compound A), with topical application to one ear at  $t = 0$  with 20  $\mu\text{L}$  of an acetone solution containing 0.01 wt% by volume of 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)-6-benzo[b]thiophene carboxylic acid. Simultaneously, 5 (=group 2) of the 10 mice treated with compound A receive a topical application, at  $t = 0$ , of 0.1 wt% by volume of *trans* 7-[3-(1-adamantyl)-4-methoxyphenyl]-3,7-dimethyl-2,4,6-heptatrieneoic acid (compound X) in acetone starting at  $t = 0$ . The 5 mice that were not treated with compound X make up group 1. The response is quantified by measurement of the ear thickness at  $t = 5$  or 6 days. The results are then expressed in % inhibition calculated as follows:

$$\frac{\text{mouse ear thickness (Group 1)} - \text{mouse ear thickness (Group 2)}}{\text{mouse ear thickness (Group 1)}} \times 100$$

Compound X is shown by another test to be a RARs antagonist. In fact, the antagonist activity of compound X is evaluated in the test of differentiation of murine embryo teratocarcinoma F9 cells (Cancer Research 43:5268, 1983). This compound tested at  $10^{-6}$  M is inactive as an agonist in this test, and it partly or totally inhibits the effect produced by an agonist retinoid on the morphology and the secretion of the plasminogen activator (the plasminogen activator secretion which accompanies the differentiation of F9 cells being an index of the biological response of the F9 cells to retinoids).

The results obtained are brought together in Table 1, below.

Table 1.

①	voie topique	dose (%P/V)	①	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
②	composé A	③ 0,01	②	composé X	③ 0,1	58,60
④ P/V signifie poids par volume.						

Key: 1 Topical route  
 2 Compound \_\_\_\_  
 3 Dose (% w/v)  
 4 w/v means weight per volume

Thus, this test clearly shows that the combination of a RARs receptor agonist with a RARs receptor antagonist significantly inhibits the response of the mouse ear in comparison with the response induced by a single topical application of a RARs receptor ligand.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 2

The same test is performed as in Example 1, except that compound A is replaced by all-trans retinoic acid (compound B).

The results obtained are brought together in Table 2.

Table 2

①	voie topique	dose (%P/V)	①	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
②	composé B	③ 0,1	②	composé X	③ 0,1	32
④ P/V signifie poids par volume.						

Key: 1 Topical route  
 2 Compound \_\_\_\_  
 3 Dose (% w/v)  
 4 w/v means weight per volume

Example 3

The same test is performed as in Example 1, except that compound X is replaced by a compound Y: 4-[3-(1-adamantyl)-4-methoxyethoxymethoxyphenylethynyl]benzoic acid, or by a compound Z: 4-[7-(1-adamantyl)-6-methoxyethoxymethoxy-2-naphthyl]benzoic acid.

Compounds Y and Z also prove to be RARs antagonists; the antagonist activity of compounds Y and Z has been evaluated in the test of differentiation of murine embryo teratocarcinoma F9 cells, as described in Example 1.

The results obtained are shown in Table 3.

Table 3

③	voie topique	dose (%P/V)	③	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
②	composé A	③ 0,01	③	composé Y	③ 0,1	81
②	composé A	0,01	②	composé Z	0,1	92
④ P/V signifie poids par volume.						

Key: 1 Topical route  
 2 Compound \_\_\_\_  
 3 Dose (% w/v)  
 4 w/v means weight per volume

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Example 4

Exactly the same test as in Example 1 is carried out, except that compound A is replaced by compound B (as described in Example 2), and compound X is replaced by compounds Y or Z (as described in Example 3).

The results are shown in Table 4:

Table 4

①	voie topique	dose (%P/V)	②	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
③	composé B	③ 0,1	⑤	composé Y	③ 0,1	32
②	composé B	0,1	⑥	composé Z	0,1	86

Key: 1 Topical route  
 2 Compound \_\_\_\_  
 3 Dose (% w/v)  
 4 w/v means weight per volume

Example 5

Exactly the same test as in Example 1 is carried out, except that compounds Z and W, replacing compound X, are administered orally in Cremophor (EL 25%) oil instead of being applied topically at the doses indicated in Table 5.

Compound W is: p-[(E)-2-[3',4'-dihydro-4',4'-dimethyl-7'-(heptyloxy)-2'H-1-benzothiopyran-6'-yl]propenyl]benzoic acid.

Compound W proves to be a RARs antagonist; the antagonist activity of this compound has been evaluated in the test of differentiation of murine embryo teratocarcinoma F9 cells, as described in Example 1.

The results are shown in Table 5.

Table 5

①	voie topique	dose (%P/V)	③	voie orale	dose (%P/V)	Inhibition (%)
④	composé A	② 0,01	⑤	composé Z	④ 30 ②	45
④	composé A	0,01	⑥	composé W	④ 30	79

Key: 1 Topical route  
 2 Dose (% v/w)  
 3 Oral route  
 4 Compound \_\_\_\_

THIS PAGE BLANK (USPTO)



### Claims

1. Process for identifying RARs antagonist molecules, characterized in that it includes the following stages: (i) topical application to a part of mammalian skin of a sufficient quantity of a RARs agonist molecule, (ii) systemic or topical administration to this same mammal or the same part of the mammal's skin before, during, or after stage (i), of a molecule capable of presenting RARs antagonist activity, and (iii) evaluation of the response of the treated mammal's skin and comparison with the response obtained on this same part of the skin treated only with stage (i).

2. Process according to the preceding claim, characterized in that the mammal is a rodent such as a mouse, rat, guinea pig, hamster, or rabbit.

3. Process according to either of the preceding claims, characterized in that the part of the mammal's skin used is the skin of the ear.

4. Process according to any of the preceding claims, characterized in that the response to be evaluated in stage (iii) corresponds to a change in the thickness of the treated part of the mammal's skin.

5. Process according to any of the preceding claims, characterized in that the RARs agonist molecule is chosen from the compounds that can induce differentiation of murine embryo teratocarcinoma (F9) cells.

6. Process according to the preceding claim, characterized in that the RARs agonist molecule used is chosen from:

- all-trans retinoic acid
- 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)-6-benzo[b]thiophene carboxylic acid
- 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carboxamido]benzoic acid
- 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl]benzoic acid

7. Process according to any of the preceding claims, characterized in that the systemic route is the oral route.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EUROPEAN PATENT OFFICE  
EUROPEAN PATENT NO. 0 749 755 A3

Int. Cl.<sup>6</sup>: A 61 K 49/00  
//A 61 K 31:07  
A 61 K 31:19  
A 61 K 31:38

Filing No.: 96401170.4

Filing Date: May 31, 1996

A2 Publication Date: December 27, 1996  
Bulletin 1996/52

A3 Publication Date: March 5, 1997  
Bulletin 1997/10

Designated Contracting States: CH DE FR GB LI

Priority  
Date: June 19, 1995  
Country: FR  
No.: 9507302

PROCESS FOR IDENTIFYING RARS RECEPTOR ANTAGONIST COMPOUNDS

Inventors: Michel Demarchez  
06620 Le Bar sur Loup (FR)

André Jomard  
06460 Saint Vallier de Thiey (FR)

Applicant: INTERNATIONAL CENTER FOR  
DERMATOLOGICAL  
RESEARCH, GALDERMA  
(C.I.R.D. GALDERMA)  
F-06560 Valbonne (FR)

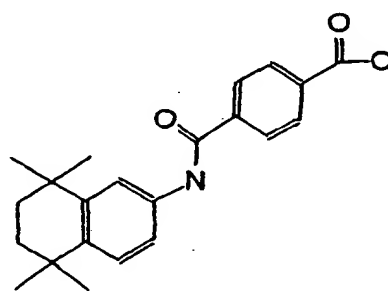
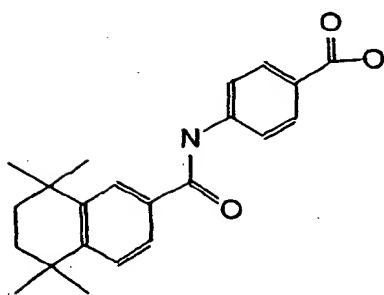
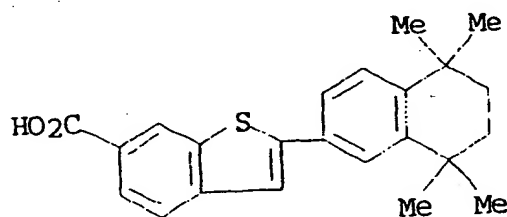
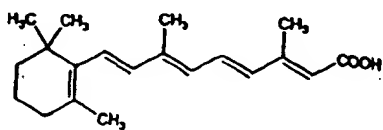
Agent: Christophe André Louis Andral  
L'OREAL  
Charles Zviak Research Center  
Industrial Property Department

THIS PAGE BLANK (USPTO)

90, rue du General Roguet  
92583 Clichy Cedex (FR)

[Abstract]

This invention pertains to a process for identifying RARs antagonist molecules, characterized in that it includes the following stages: (i) a sufficient quantity of a RARs agonist molecule is applied topically to part of the skin of a mammal; (ii) a molecule capable of exhibiting RARs antagonist activity is administered systemically or topically to the same mammal or to this same part of the mammalian skin before, during, or after stage (i); and (iii) the response of the part of the mammalian skin treated is evaluated in this way.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

European  
Patent Office

Application Number  
EP 96 40 1170

## EUROPEAN PARTIAL SEARCH REPORT

Applicable as per Rule 45 of the European Patent Agreement; to be used hereafter as European search report.

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. <sup>6</sup> )
X	BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., VOL. 186, NO. 2, PAGE(S) 977-83, 1992, XP002000222 BERNARD, BRUNO A. ET AL: "Identification of synthetic retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor gamma." *abstract* *Material and methods paragraph*	1-7	A61K49/00 //A61K31:07, A61K31:19, A61K31:38
X	BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., VOL. 179, NO. 3, PAGE(S) 1554-61, 1991, XP002000223 GRAUPNER, GERHART ET AL: "6-Substituted naphthalene-2-carboxylic acid analogs, a new class of retinoic acid receptor subtype-specific ligands" *abstract* Results and discussion paragraph *Table 1*	1-7	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. <sup>6</sup> ) A61K
INCOMPLETE SEARCH			
<p>The search department is of the opinion that one or more claims does/do not correspond to the requirements of the EPU to the extent that it is possible only in part, if at all, to provide a meaningful assessment of the state of the art for these claims.</p> <p>Fully researched patent claims:</p> <p>Incompletely researched patent claims:</p> <p>Not researched patent claims:</p> <p>Reason for limitation of the research:</p> <p>See Supplementary Sheet C</p>			
Place of search The Hague		Date of completion of the search December 18, 1996	Examiner Dullaart, A.
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
<p>X: Particularly relevant if taken alone.</p> <p>Y: Particularly relevant if combined with another document of the same category.</p> <p>A: Technological background.</p> <p>O: Non-written disclosure.</p> <p>P: Intermediate document.</p> <p>T: Theory or principle underlying the invention.</p> <p>E: Earlier patent document, but published on, or after the filing date.</p> <p>D: Document cited in the application.</p> <p>L: Document cited for other reasons.</p> <p>&amp;: Member of the same patent family, corresponding document.</p>			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



EP 0 749 755 A3

European Patent Office

EP 96 40 1170 -C-

**INCOMPLETE SEARCH**

The Search Division believes that this European Patent application does not comply with the provisions of the European Patent Convention, so that a meaningful search on the state of the art cannot be done for part of the claims

Claims that have been the subject of complete searches

Claims that have been the subject of incomplete searches: 1-5 and 7

Claims that have not been the subject of searches.

Reason for limitation of the search: Because of the large number of compounds theoretically covered by the general definition of Claims 1-5 and 7, the search had to be restricted for economic reasons. The search was limited to compounds for which the pharmacological data are provided and/or to the compounds mentioned in the claims and/or the compounds mentioned in the descriptions (see Directives, Part B, Chapter III, paragraph 3.6).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

FRENCH REPUBLIC  
National Institute  
of Industrial Property

Application Number  
EP 96 40 1170

### PARTIAL PRELIMINARY SEARCH REPORT

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Claims concerned	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. <sup>6</sup> )
Category	Citation of document with indication where appropriate, of relevant passages		
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1988, VOL. 171, NO. 2, PAGE(S) 238-247, XP000566436 GAZITH J ET AL: "AN IMPROVED ASSAY PROCEDURE AND A NEW CHEMICALLY STABLE LIGAND FOR CYTOSOLIC RETINOIC ACID BINDING PROTEIN" *Results and discussion paragraph* *Conclusions paragraph*	1-7	
X	GENES DEV., 1994, VOL. 8, NO. 24, PAGE(S) 3068- 3079, XP000566433 VALCARCEL R. ET AL: "Retinoid-dependent in vitro transcription mediated by the RXR/RAR heterodimer" *page 3075* *page 3076*	1-7	
X	A.R. GENNARO (ED.): "Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. 17" 1985, MACK PUBLISHING CO., EASTON, US XP002021507 *page 178 - page 721*	1-7	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. <sup>6</sup> )

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 0 749 755 A2**

(12)

# DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:  
27.12.1996 Bulletin 1996/52

(51) Int Cl. 6: **A61K 49/00**

(21) Numéro de dépôt: **96401170.4**

(22) Date de dépôt: **31.05.1996**

(84) Etats contractants désignés:  
**CH DE FR GB LI**

(30) Priorité: **19.06.1995 FR 9507302**

(71) Demandeur: **CENTRE INTERNATIONAL DE  
RECHERCHES DERMATOLOGIQUES  
GALDERMA (C.I.R.D. GALDERMA)  
F-06560 Valbonne (FR)**

(72) Inventeurs:  
• **Demarchez, Michel  
06620 Le Bar sur Loup (FR)**

• **Jomard, André  
06460 Saint Vallier de Thiey (FR)**

(74) Mandataire: **Andral, Christophe André Louis  
L'OREAL  
Centre de Recherche Charles Zviak  
Département Propriété Industrielle  
90, rue du Général Roguet  
92583 Clichy Cedex (FR)**

(54) **Procédé pour identifier des composés antagonistes des récepteurs RARs**

(57) La présente invention concerne un procédé pour identifier des molécules antagonistes des RARs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :  
(i) on applique topiquement sur une partie de la peau d'un mammifère une quantité suffisante d'une molécule agoniste des RARs, (ii) on administre par voie systémi-

que ou topique sur ce même mammifère ou sur cette même partie de la peau du mammifère, avant, pendant ou après l'étape (i), une molécule susceptible de présenter une activité antagoniste des RARs et (iii) on évalue la réponse sur la partie de la peau ainsi traitée du mammifère.

**EP 0 749 755 A2**

## Description

La présente invention a pour objet un procédé pour identifier des composés antagonistes des récepteurs RARs en utilisant un mammifère, tel que les rongeurs (rat, cobaye, hamster, lapin, souris...).

5 On sait que l'acide rétinolique *tout-trans* est un puissant modulateur (i.e. un inhibiteur ou, au contraire, un stimulateur, selon la nature des cellules traitées) de la différenciation et de la prolifération de nombreux types cellulaires normaux ou transformés. Par exemple, il inhibe la différenciation des cellules épithéliales, tels que les kératinocytes de l'épiderme. Il inhibe aussi la prolifération de nombreuses cellules transformées telles que les cellules de mélanomes.

10 On sait, d'une manière générale, que l'acide rétinolique *tout-trans* (*all-trans* retinoic acid) agit sur la différenciation et la prolifération des cellules en interagissant avec des récepteurs nucléaires appelés RARs (Retinoic Acid Receptors) contenus dans le noyau cellulaire. Ces récepteurs, après fixation du ligand (i.e. de l'acide rétinolique *tout-trans*), interagissent avec la région promotrice de gènes régulés par l'acide rétinolique au niveau d'éléments de réponses spécifiques. Pour se fixer sur les éléments de réponse, les RARs s'hétérodimérisent avec un autre type de récepteurs connus sous le nom de RXRs, le ligand naturel des RXRs étant l'acide 9-*cis*-rétinoïque.

15 De nombreux analogues structuraux synthétiques de l'acide rétinolique *tout-trans* ou de l'acide 9-*cis*-rétinoïque, couramment dénommés "rétinoides", ont été décrits à ce jour dans la littérature. Certaines de ces molécules sont capables de se fixer et d'activer (agonistes) ou à l'inverse de désactiver (antagonistes) spécifiquement les RARs. Par exemple, l'acide rétinolique *tout-trans* active sélectivement les RARs et ainsi est considéré comme une molécule agoniste des RARs.

20 Chez la souris, il a été montré que l'acide rétinolique *tout-trans* en administration unique par voie topique induit une réponse, dépendante de la dose, de prolifération de l'épiderme, avec un maximum de réponse quatre jours après l'application ("Retinoic acid provokes a regeneration-like proliferative response in murine epidermis" Arch. Dermatol. Res. 1992, 284:418-423). En accord avec ce résultat, la réponse à une application topique d'acide rétinolique *tout-trans* sur l'oreille de souris se traduit notamment par une augmentation de l'épaisseur de l'oreille de souris. Cette augmentation de l'épaisseur de l'oreille de souris semble être due à une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et à une apparition d'un oedème dermique. Cette réponse peut donc être facilement mesurée à l'aide d'un appareil, tel que l'oditest, celle-ci étant maximale aux cinquième et sixième jours après l'application. Cette réponse se vérifie avec toutes les molécules agonistes des RARs.

30 En ce qui concerne les antagonistes des RARs, ceux-ci s'avèrent notamment intéressants dans le traitement de désordres ou des affections dermatologiques, rhumatismales, respiratoires, cardiovasculaires, osseuses ou encore ophtalmologiques notamment liées à une surrégulation (surexpression ou suractivité) des récepteurs RARs et/ou à une hypervitaminose A (présence dans l'organisme d'une quantité anormale de vitamine A ou de ses métabolites). Ainsi, on comprend l'intérêt de trouver de nouveaux composés antagonistes RARs qui peuvent venir inhiber les effets biologiques d'une surrégulation des récepteurs RARs et/ou d'une hypervitaminose A.

35 La Demanderesse vient de découvrir que la réponse à une application topique sur la peau d'un mammifère d'une molécule agoniste des RARs peut être inhibée par l'administration par voie systémique ou topique d'une molécule antagoniste des RARs.

Ainsi, la présente invention a pour but de proposer un procédé simple pour identifier des molécules antagonistes des RARs.

40 Ce but et d'autres sont atteints par la présente invention qui concerne un procédé pour identifier des molécules antagonistes des RARs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : (i) on applique topiquement sur une partie de la peau d'un mammifère une quantité suffisante d'au moins une molécule agoniste des RARs, (ii) on administre par voie systémique ou topique sur ce même mammifère ou sur cette même partie de la peau du mammifère, avant, pendant ou après l'étape (i), une molécule susceptible de présenter une activité antagoniste des RARs et (iii) on évalue la réponse de la partie de la peau ainsi traitée du mammifère et on la compare avec la réponse obtenue sur cette même partie de peau traitée par la seule étape (i).

45 Ainsi, lorsque la molécule administrée est un antagoniste des RARs, l'augmentation de l'épaisseur de la partie de la peau traitée du mammifère par une molécule agoniste des RARs n'est pas constatée ou est diminuée. On observe donc une inhibition de la réponse.

50 De manière pratique, le mammifère est un rongeur tel qu'une souris, un rat, un cobaye, un hamster ou un lapin. La partie de la peau de mammifère utilisée peut être n'importe quelle partie du corps du mammifère.

La réponse sur la partie de la peau ainsi traitée du mammifère à évaluer correspond à une modification clinique de celle-ci. De manière générale, cette réponse à évaluer correspond à une modification de l'épaisseur de la partie de la peau ainsi traitée.

55 Ainsi, la mesure de l'épaisseur de la partie de la peau ainsi traitée peut être réalisée par toute méthode connue en soi.

Lorsque la partie de la peau utilisée est lisse, on peut mesurer son épaisseur en la pliant.

De manière plus pratique, on utilise la peau de l'oreille. La mesure de l'épaisseur de l'oreille peut alors être réalisée

par un oditest.

Bien entendu, l'évaluation de l'étape (iii) correspond à une mesure de la réponse de la partie de la peau ainsi traitée et à une comparaison de cette mesure avec celle de la réponse de cette même partie de la peau traitée, dans les mêmes conditions, avec la molécule agoniste des RARs seule.

De préférence, les molécules agonistes des RARs sont choisis parmi les composés capables d'induire la différenciation des cellules (F9) du tératocarcinome embryonnaire de souris. La sécrétion de l'activateur plasminogène qui accompagne cette différenciation est un indice de la réponse biologique des cellules F9 à ces composés. On sait également que la capacité de ces composés à induire l'activateur plasminogène est corrélé directement avec l'affinité et l'activité qu'ils ont sur les récepteurs RARs endogènes aux cellules F9 (Skin Pharmacol., 1990, 3, pp. 256-267).

Parmi les molécules agonistes des RARs induisant la différenciation des cellules F9, on peut plus particulièrement citer

- l'acide rétinolique *tout-trans*,
- l'acide 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphtyl)-6-benzo[b]thiophen carboxylique,
- l'acide 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphtyl) carboxamido] benzoïque,
- l'acide 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphtyl) carbamoyl] benzoïque.

Dans ce qui suit ou ce qui précède, on entend par voie topique, toute technique d'administration d'un produit par application directe de ce dernier sur une partie superficielle (ou externe) du corps, et par voie systémique, toute technique d'administration d'un produit par une voie autre que topique, par exemple entérale et/ou parentérale. Dans le cas de la voie systémique, on préfère utiliser la voie orale.

La quantité suffisante d'une molécule agoniste des RARs à appliquer correspond à celle à laquelle on observe une réponse de la partie traitée de la peau du mammifère après l'étape (i). Ainsi, de préférence et selon la nature de la molécule agoniste des RARs utilisée, cette quantité varie entre 0,0001% et 2% en poids par volume de solution appliquée.

On va maintenant donner, à titre nullement limitatif, plusieurs exemples.

#### EXEMPLE 1

Le test utilisé est donc celui de l'œdème de l'oreille de souris induit par application topique de l'acide 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphtyl)-6-benzo[b]thiophen carboxylique (analogue de l'acide rétinolique *tout-trans*) à 0,01% en poids par volume. Selon ce modèle, une application topique de l'acide 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphtyl)-6-benzo[b]thiophen carboxylique sur l'oreille provoque une inflammation qui se caractérise par une augmentation de l'épaisseur de l'oreille de souris, cette augmentation devenant maximal au bout de 5 jours après l'application. Cette réponse peut donc être quantifiée par une mesure de l'épaisseur de l'oreille par un oditest.

Le protocole opératoire exact est le suivant : 10 souris sont tout d'abord traitées avec l'acide 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphtyl)-6-benzo[b]thiophen carboxylique (composé A), en procédant sur l'une de leur oreille à une application topique à un temps t=0 avec 20 µl d'une solution d'acétone comprenant 0,01 % en poids par volume d'acide carboxylique 2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphtyl)-6-benzo[b]thiophen. Simultanément, on applique en une fois par voie topique, sur 5 (= groupe 2) des 10 souris traitées par le composé A, 0,1 % en poids par volume de l'acide *trans* 7-[3-(1-adamantyl)-4-méthoxyphényl]-3,7-diméthyl-2,4,6-heptatriénoïque (composé X) dans de l'acétone à partir de t=0. Les 5 souris n'ayant pas été traitées par le composé X constituent le groupe 1. La réponse est quantifiée par une mesure de l'épaisseur de l'oreille à t = 5 ou 6 jours. Les résultats sont ensuite exprimés en % d'inhibition calculé de la façon suivante :

45

$$\frac{\text{épaisseur oreille souris (Groupe 1)} - \text{épaisseur oreille souris (Groupe 2)}}{\text{épaisseur oreille souris (Groupe 1)}} \times 100$$

Le composé X se révèle par un autre test comme étant un antagoniste des RARs. En effet, l'activité antagoniste du composé X est évaluée dans le test de différenciation des cellules F9 de tératocarcinome embryonnaire de souris (Cancer Research 43, p 5268, 1983). Ce composé testé à 10<sup>-6</sup> M est inactif en tant qu'agoniste dans ce test et inhibe partiellement ou totalement l'effet produit par un rétinolide agoniste sur la morphologie et sur la sécrétion de l'activateur du plasminogène (la sécrétion de l'activateur du plasminogène qui accompagne la différenciation des cellules F9 étant un indice de la réponse biologique des cellules F9 aux rétinolides).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1 suivant.

## EP 0 749 755 A2

tableau 1

voie topique	dose (%P/V)	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
composé A	0,01	composé X	0,1	58.60
P/V signifie poids par volume.				

Ainsi, on démontre clairement, grâce à ce test, que l'association d'un agoniste de récepteurs RARs avec un antagoniste des récepteurs RARs inhibe de manière importante la réponse de l'oreille de souris comparativement à la réponse induite par une application topique unique d'un ligand de récepteurs RARs.

### EXEMPLE 2

On réalise exactement le même test qu'à l'exemple 1, sauf que le composé A est remplacé par l'acide rétinolique *tout-trans* (composé B).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 2 suivant.

tableau 2

voie topique	dose (%P/V)	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
composé B	0,1	composé X	0,1	32
P/V signifie poids par volume.				

### EXEMPLE 3

On réalise exactement le même test qu'à l'exemple 1, sauf que le composé X est remplacé par un composé Y: Acide 4-[3-(1-adamantyl)-4-methoxyethoxymethoxyphenylethynyl]benzoïque ou par un composé Z: Acide 4-[7-(1-adamantyl)-6-méthoxyéthoxyméthoxy-2-naphtyl]benzoïque.

Les composés Y et Z se révèlent par ailleurs comme étant des antagonistes des RARs, l'activité antagoniste des composés Y et Z ayant été évaluée dans le test de différenciation des cellules F9 de tératocarcinome embryonnaire de souris, tel que décrit dans l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 3 suivant.

tableau 3

voie topique	dose (%P/V)	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
composé A	0,01	composé Y	0,1	81
composé A	0,01	composé Z	0,1	92
P/V signifie poids par volume.				

### EXEMPLE 4

On réalise exactement le même test qu'à l'exemple 1, sauf que le composé A est remplacé par le composé B (tel que décrit à l'exemple 2) et le composé X est remplacé par les composés Y ou Z (tels que décrits à l'exemple 3).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4 suivant :

tableau 4

voie topique	dose (%P/V)	voie topique	dose (%P/V)	Inhibition (%)
composé B	0,1	composé Y	0,1	32
composé B	0,1	composé Z	0,1	86

### EXEMPLE 5

On réalise exactement le même test qu'à l'exemple 1, sauf que les composés Z et W, remplaçant le composé X, sont administrés par voie orale dans de l'huile de type cremophor (EL 25%), au lieu d'être appliqués par voie topique, aux doses indiquées dans le tableau 5 ci-dessous.



## EP 0 749 755 A2

Le composé W est : Acide p-[(E)-2-[3',4'-dihydro-4',4'-diméthyl-7'-(heptyloxy)-2'H-1-benzothiopyran-6'-yl]propenyl]-benzoïque

Le composé W se révèle par ailleurs comme étant un antagoniste des RARs, l'activité antagoniste de ce composé ayant été évaluée dans le test de différenciation des cellules F9 de tératocarcinome embryonnaire de souris tel que décrit dans l'exemple 1

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5 suivant :

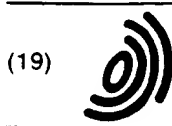
tableau 5

voie topique	dose (%P/V)	voie orale	dose (%P/V)	Inhibition (%)
composé A	0.01	composé Z	30	45
composé A	0.01	composé W	30	79

### Revendications

- Procédé pour identifier des molécules antagonistes des RARs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : (i) on applique topiquement sur une partie de la peau d'un mammifère une quantité suffisante d'une molécule agoniste des RARs, (ii) on administre par voie systémique ou topique sur ce même mammifère ou sur cette même partie de la peau du mammifère, avant, pendant ou après l'étape (i), une molécule susceptible de présenter une activité antagoniste des RARs et (iii) on évalue la réponse de la partie de la peau ainsi traitée du mammifère et on la compare avec la réponse obtenue sur cette même partie de peau traitée par la seule étape (i).
- Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le mammifère est un rongeur tel qu'une souris, un rat, un cobaye, un hamster ou un lapin.
- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie de la peau de mammifère utilisée est la peau de l'oreille.
- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la réponse à évaluer à l'étape (iii) correspond à une modification de l'épaisseur de la partie de la peau ainsi traitée du mammifère.
- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la molécule agoniste des RARs est choisie parmi les composés capables d'induire la différenciation des cellules (F9) du tératocarcinome embryonnaire de souris.
- Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la molécule agoniste des RARs utilisée est choisie parmi :
  - l'acide rétinolique *tout-trans*,
  - l'acide 2-(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphtyl)-6-benzo[b]thiophen carboxylique,
  - l'acide 4-[(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphtyl) carboxamido] benzoïque,
  - l'acide 4-[(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphtyl) carbamoyl] benzoïque.
- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la voie systémique est la voie orale.





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 0 749 755 A3**

(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(88) Date de publication A3:  
05.03.1997 Bulletin 1997/10

(51) Int Cl.<sup>6</sup> **A61K 49/00**  
// A61K31:07, A61K31:19,  
A61K31:38

(43) Date de publication A2:  
27.12.1996 Bulletin 1996/52

(21) Numéro de dépôt: **96401170.4**

(22) Date de dépôt: **31.05.1996**

(84) Etats contractants désignés:  
**CH DE FR GB LI**

• **Jomard, André**  
**06460 Saint Vallier de Thiey (FR)**

(30) Priorité: **19.06.1995 FR 9507302**

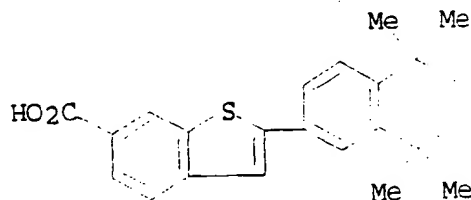
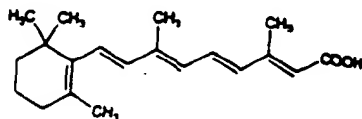
(74) Mandataire: **Andral, Christophe André Louis**  
**L'OREAL**  
**Centre de Recherche Charles Zviak**  
**Département Propriété Industrielle**  
**90, rue du Général Roguet**  
**92583 Clichy Cedex (FR)**

(71) Demandeur: **CENTRE INTERNATIONAL DE**  
**RECHERCHES DERMATOLOGIQUES**  
**GALDERMA (C.I.R.D. GALDERMA)**  
**F-06560 Valbonne (FR)**

(72) Inventeurs:  
• **Demarchez, Michel**  
**06620 Le Bar sur Loup (FR)**

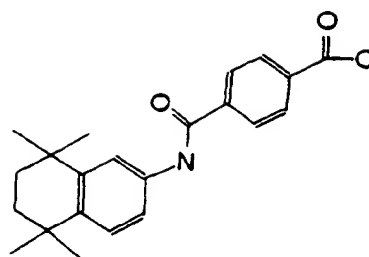
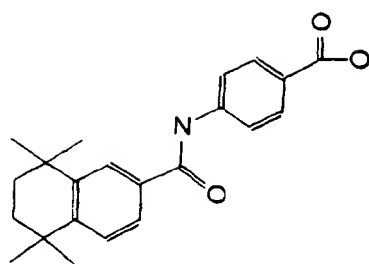
(54) **Procédé pour identifier des composés antagonistes des récepteurs RARs**

(57) La présente invention concerne un procédé pour identifier des molécules antagonistes des RARs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : (i) on applique topiquement sur une partie de la peau d'un mammifère une quantité suffisante d'une molécule agoniste des RARs, (ii) on administre par voie systémique ou topique sur ce même mammifère ou sur cette même partie de la peau du mammifère, avant, pendant ou après l'étape (i), une molécule susceptible de présenter une activité antagoniste des RARs et (iii) on évalue la réponse sur la partie de la peau ainsi traitée du mammifère.



EP 0 749 755 A3

EP 0 749 755 A3





Office européen  
des brevets

# RAPPORT PARTIEL DE RECHERCHE EUROPEENNE

qui selon la règle 45 de la Convention sur le brevet  
européen est considéré, aux fins de la procédure ultérieure  
comme le rapport de la recherche européenne

Numero de la demande

EP 96 40 1170

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
X	BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., VOL. 186, NO. 2, PAGE(S) 977-83, 1992, XP002000222 BERNARD, BRUNO A. ET AL: "Identification of synthetic retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor.gamma." * abrégé * * paragraphe Materials and methods *	1-7	A61K49/00 //A61K31:07, A61K31:19, A61K31:38
X	BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., VOL. 179, NO. 3, PAGE(S) 1554-61, 1991, XP002000223 GRAUPNER, GERHART ET AL: "6-Substituted naphthalene-2-carboxylic acid analogs, a new class of retinoic acid receptor subtype-specific ligands" * abrégé * * paragraphe Reslts and discussion * * tableau 1 *	1-7	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCIES (Int.Cl.6)
			A61K
RECHERCHE INCOMPLETE			
<p>La division de la recherche estime que la présente demande de brevet européen n'est pas conforme aux dispositions de la Convention sur le brevet européen au point qu'une recherche significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendications.</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes:</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:</p> <p>Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:</p> <p>Raison pour la limitation de la recherche:</p> <p>voir feuille supplémentaire C</p>			
Lieu de la recherche		Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
LA HAYE		18 Décembre 1996	Dullaart, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul</p> <p>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</p> <p>A : arrière-plan technologique</p> <p>O : divulgation non-écrite</p> <p>P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention</p> <p>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date</p> <p>D : cité dans la demande</p> <p>I : cité pour d'autres raisons</p> <p>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	



---

**RECHERCHE INCOMPLETE**

---

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet européen n'est pas conforme aux dispositions de la Convention sur le brevet européen au point qu'une recherche significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendications.

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes:

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes: 1-5 et 7

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:

Raison pour la limitation de la recherche: A cause du grand nombre de composés, que définit théoriquement la définition générale des revendication(s) 1-5 et 7, la recherche a du être restreinte pour des raisons d'économie. La recherche a été limitée aux composés pour lesquels des données pharmacologiques sont fournies et/ou aux composés mentionnés dans les revendications et/ou aux composés mentionnés dans la descriptions (voir Directives, Partie B, Chapitre III, paragraphe 3.6).



Office européen  
des brevets

**RAPPORT PARTIEL  
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

Numero de la demande  
EP 96 40 1170

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.CL.6)
Categorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes	Revendication concernée	
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1988, VOL. 171, NO. 2, PAGE(S) 238-247., XP000566436 GAZITH J ET AL: "AN IMPROVED ASSAY PROCEDURE AND A NEW CHEMICALLY STABLE LIGAND FOR CYTOSOLIC RETINOIC ACID BINDING PROTEIN" * paragraphe Results and Discussion * * paragraphe Conclusions *	1-7	
X	GENES DEV., 1994, VOL. 8, NO. 24, PAGE(S) 3068-3079, XP000566433 VALCARCEL R. ET AL: "Retinoid-dependent in vitro transcription mediated by the RXR/ RAR heterodimer" * page 3075 * * page 3076 *	1-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
X	A.R. GENNARO (ED.): "Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. 17" 1985, MACK PUBLISHING CO., EASTON, US XP002021507 * page 718 - page 721 *	1-7	

EP0 FORM 100 (04/81) (P/CL11)

THIS PAGE BLANK (USPTO)